

日本国特許庁 28.07.00

PATENT OFFICE

JAPANESE GOVERNMENT

10/048230

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 7月29日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第215667号

REC'D 12 SEP 2000

WIPO

PCT

出願人

Applicant(s):

工業技術院長

財団法人 化学技術戦略推進機構

JP00/05113

EJU

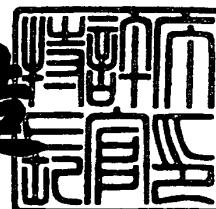
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月 1日

特許庁長官
Commissioner
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3069036

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-32599

【提出日】 平成11年 7月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東一丁目1番 財団法人化学技術戦略推進機構内

【氏名】 大西 徳幸

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東一丁目1番 財団法人化学技術戦略推進機構内

【氏名】 吉田 三喜子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京大学大学院工学部内

【氏名】 片岡 一則

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東一丁目1番 工業技術院物質工学工業技術研究所内

【氏名】 上野 勝彦

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮朗

【特許出願人】

【識別番号】 597071652

【氏名又は名称】 財団法人化学技術戦略推進機構

【指定代理人】

【識別番号】 220000390

【弁理士】

【氏名又は名称】 工業技術院物質工学工業技術研究所長 久保田 正明

【代理関係の特記事項】 特許出願人工業技術院長の指定代理人

【代理人】

【識別番号】 100073874

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 平

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人財団法人化学技術戦略推進機構の代理人

【復代理人】

【識別番号】 100073874

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 平

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人工業技術院長の復代理人

【選任した代理人】

【識別番号】 100093573

【弁理士】

【氏名又は名称】 添田 全一

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人財団法人化学技術戦略推進機構の代理人

【選任した代理人】

【識別番号】 100105474

【弁理士】

【氏名又は名称】 本多 弘徳

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人財団法人化学技術戦略推進機構の代理人

【選任した代理人】

【識別番号】 100090343

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗宇 百合子

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人財団法人化学技術戦略推進機構の代理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100093573

【弁理士】

【氏名又は名称】 添田 全一

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人工業技術院長の復代理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100105474

【弁理士】

【氏名又は名称】 本多 弘徳

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人工業技術院長の復代理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100090343

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗宇 百合子

【電話番号】 03-5561-3990

【代理関係の特記事項】 特許出願人工業技術院長の復代理人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008763

【納付金額】 13,860円

【その他】 国以外のすべての者の持分の割合 66／100

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1
【ブルーフの要否】	要

【書類名】 明細書

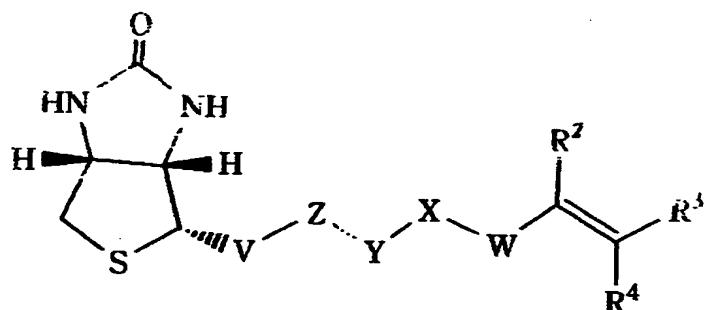
【発明の名称】 重合性ビオチン誘導体、ビオチン高分子化合物及びアビジン刺激応答性高分子化合物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(I)で示される重合性ビオチン誘導体

【化1】

一般式(I)



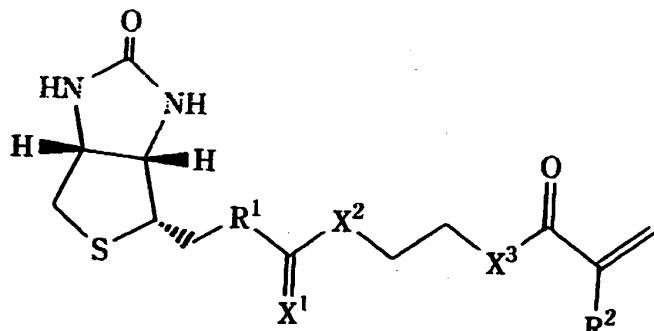
式(I)中、R²は水素原子又はアルキル基を示す。R³及びR⁴はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示す。

Wは単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基もしくは炭素数1～5のアルキレン基を示す。Xは単結合又は炭素数1～8の炭化水素結合、酸素原子もしくは-NH基を示す。Yは単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、1,2-ジオキシエチレン基もしくは1,2-ジアミノエチレン基を示す。Zは単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、炭素数1～5のアルキレン基、酸素原子もしくは-NH基を示す。Vは単結合又は炭素数1～5のアルキレン基を示す。

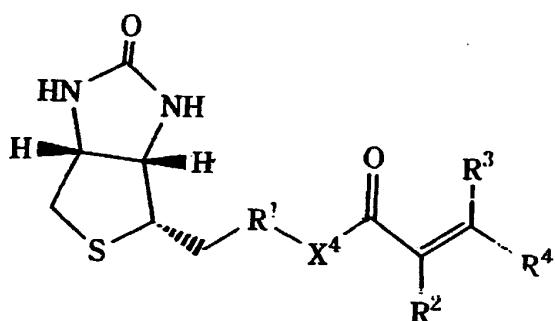
【請求項2】 下記一般式(Ia)～(Ic)で示される重合性ビオチン誘導体。

【化2】

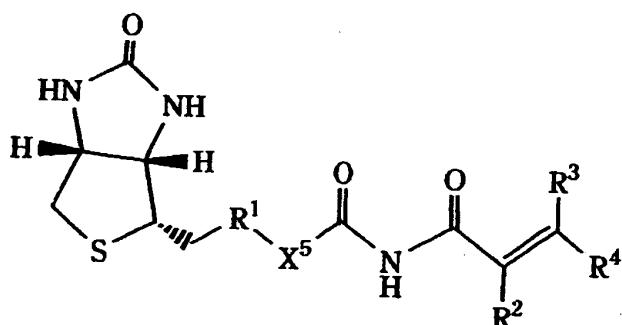
一般式 (I a)



一般式 (I b)



一般式 (I c)



一般式 (I a) ~ (I c) 中、R¹は単結合又は炭素数1~4のアルキレン基を示す。

X¹は酸素原子又は硫黄原子を示し、X²~X⁵はそれぞれ独立に、酸素原子又は-NH基を示す。

R²、R³及びR⁴はそれぞれ請求項1に記載される通りである。

【請求項3】 請求項1記載の一般式 (I) で示される重合性ビオチン誘導

体を重合又は他の共重合成分と共に重合することを特徴とするビオチン成分を含有する高分子化合物の製造方法。

【請求項4】 請求項1記載の一般式(I)で示される重合性ビオチン誘導体を重合成分又は共重合成分として含有するビオチン成分を含有する高分子化合物。

【請求項5】 請求項1記載の一般式(I)で示される重合性ビオチン誘導体と、アクリルアミド又はメタクリルアミドとを共重合成分として含有する、水溶液中でUCST(上限臨界溶液温度)を有するビオチン成分を含有する高分子化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は現在盛んに行われているビオチン誘導体の固定化法として、優れた手法を提供する。さらにその誘導体を用いてビオチン部位が固定化された機能性高分子の提供に関する

【0002】

【従来の技術】

ビオチンとアビジンの高い結合性を利用して(例えばMethods Enzymol.184,5-13, 184,14-45参照)、イムノアッセイ(例えば特開平4-363659号公報、同6-160387号公報)、バイオセンサー(例えば特開平10-282040号公報、同9-292397号公報、同8-94510号公報)、DNA操作(例えば特願平8-243720号、特開平4-267896号公報)、分離材(例えば特開平5-340945号公報、同4-311397号公報)、臨床療法(例えばJ. Nucl Med Commun 1991;12:211-234. Int J. cancer 1990;45:1184-1189)などに適用されている。

【0003】

上記各種方法を行うためには、蛋白(糖蛋白)、抗体、酵素、発色団、デキストラン等にビオチンを固定化することが必要であり、そのために種々のビオチン固定化試薬が発売されている(Methods Enzymol.184,123-138)。これは、生体系

物質のアミノ基、硫黄基、カルボン酸、アルコール等の反応性の官能基にビオチン固定化試薬を反応させてビオチンを固定化するものである(例えばMolecular Probes Handbook of fluorescent Probes and Research Chemicals Chapter4参照)。かかる固定化反応にはビオチンの誘導体が用いられる(例えばMolecular Probes Handbook of fluorescent Probes and Research Chemicals Chapter4, p87参照)。また、この試薬を用いてポリエチレングリコール末端にビオチンを固定化した例も報告されている(Bioconjugate Chem. 1997, 8, 545-551)。

【0004】

以上に記載したビオチンの固定化は、元来ある物質、たとえば蛋白などの一つの官能基について一つの反応を行いビオチンを固定化するという概念に基づくものである(例えば特開平6-148190号公報参照)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

上記の通り、ビオチンの有用性は種々の分野で実証されており、その工業的応用は新しい機能を発現する製品を導く可能性がある。しかしながら、上記ビオチン固定化試薬は高価であり、これらを用いたビオチン固定化法では、その工業的使用は難しい。また、水溶液中あるいは生理的食塩水中で降温操作により凝集する、上限臨界溶液温度 (UCST) を有する感熱性高分子は分離剤、DDS等に応用が期待され(Macromol. Chem., Rapid Commun. 13, 577-581(1992))、その高分子の出現が待望されていた。

【0006】

一方、上述したようにビオチン固定化試薬は反応性の官能基に固定化するため、官能基の保護が必要な場合があり、また立体障害が大きい官能基の場合や高分子鎖にビオチン骨格を固定化する場合などは、ビオチン固定化の反応自体が困難である。例えばマクロな高分子である蛋白などにビオチンを固定化する場合は、官能基が少なく充分な量のビオチンが固定できず、しかも蛋白表面に存在する官能基のみにしか固定化されない。高分子の重合度が高くなれば同様に従来の固定化法ではビオチンの固定化を思い通りに設計することは困難になる。

【0007】

従って、本発明は、上記種々の分野に応用可能なビオチン成分を含有し、更に多官能性、多重機能性の高分子を合成、設計可能とする目的とする。

更に、本発明は、上記ビオチン成分含有高分子を工業的に製造でき、優れた経済性及び効率性で合成、設計することを目的とする。

また、水溶液中で降温操作により凝集し、更に生理的食塩水中でも上限臨界溶液温度 (UCST) を有する感熱性高分子を提供することを目的とする。

【0008】

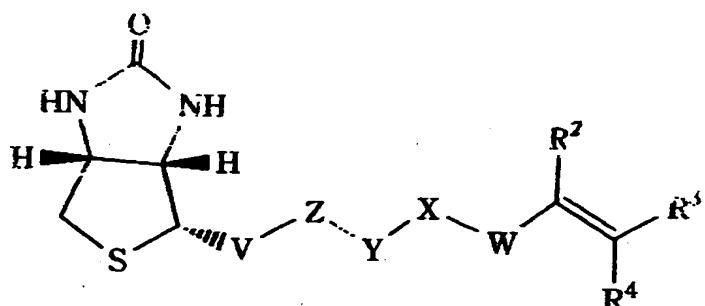
【課題を解決するための手段】

本発明の上記目的は、下記一般式 (I) で示される重合性ビオチン誘導体を用いることにより達成されることが見いだされた。

【0009】

【化3】

一般式(I)



【0010】

式 (I) 中、 R^2 は水素原子又はアルキル基を示す。 R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示す。

W は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基もしくは炭素数1～5のアルキレン基を示す。 X は単結合又は炭素数1～8の炭化水素結合、酸素原子もしくは $-NH$ 基を示す。 Y は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、1, 2-ジオキシエチレン基もしくは1, 2-ジアミノエチレン基を示す。 Z は単結合又はカルボニル基、チオカルボニル基、炭素数1～5のアルキレン基、酸素原子もしくは $-NH$ 基を示す。 V は単結合又は炭素数1～5のアルキレン基を示す。

【0011】

即ち、本発明においては、生体機能を有する上記重合性ビオチン誘導体（以下ビオチンモノマーとも称する）を重合することにより、容易かつ工業的、経済的にビオチンを固定化した高分子の合成が可能になる。

出発物質のビオチンを固定化したビオチンモノマーは工業的にも成り立つ経済性と効率性がある。

【0012】

また公知のビオチン固定化技術の如き、高分子中の官能基に反応させてビオチンを固定化するものではないため、例えば、ビオチン固定化試薬に反応する官能基を有するモノマーと共に重合させてもその官能基を未反応のまま含有する、ビオチンを固定化した形式の共重合体を合成することができる。

更に高分子鎖が官能基を包み込み、ビオチン固定化を従来の技術により行えない場合などであっても、高分子の設計を適宜行うことにより、任意の割合で長鎖の高分子側鎖としてビオチン骨格を組み込むという高分子設計が可能となる。

【0013】

また、水溶液中及び生理的食塩水中でUCSTを有する感熱性高分子においては、一般式（I）で表される少なくとも1種のモノマー成分とアクリルアミド及びメタクリルアミドから選択される少なくとも1種のモノマー成分とを含有する、水溶液中でUCSTを有する感熱高分子である。

【0014】

【発明の実施の形態】

更に本発明について詳細に説明する。

上記式（I）で示される重合性ビオチン誘導体において、好ましくはR²は水素原子又は炭素数1～3のアルキル基を示し、R³及びR⁴はそれぞれ水素原子、炭素数1～3のアルキル基又はフェニル基を示す。特に好ましくは、R²は水素原子又はメチル基を示し、R³及びR⁴はそれぞれ水素原子、メチル基又はフェニル基を示す。アルキル基及びアリール基は、必要に応じて更に置換基を有してもよい。

【0015】

式（I）において、-V-Z¹-Y¹-X¹-W¹-で表される結合基としては、

具体的には、下記表-1に記載のものが挙げられる。

【0016】

【表1】

表-1

例	V	Z	Y	X	W
i	炭素数1～5 のアルキル基	酸素原子又は -NH基	カルボニル基 又はチオカル ボニル基	単結合	単結合
ii	炭素数1～5 のアルキル基	酸素原子又は -NH基	カルボニル基 又はチオカル ボニル基	酸素原子又は -NH基	カルボニル基 又はチオカル ボニル基
iii	炭素数1～5 のアルキル基	単結合	カルボニル基 又はチオカル ボニル基	1,2-ジオキシエチ レン基又は 1,2-ジ アミノエチレン基	カルボニル基 又はチオカル ボニル基
iv	炭素数1～5 のアルキル基	単結合	単結合	単結合	単結合
v	炭素数1～5 のアルキル基	単結合	単結合	酸素原子又は -NH基	単結合

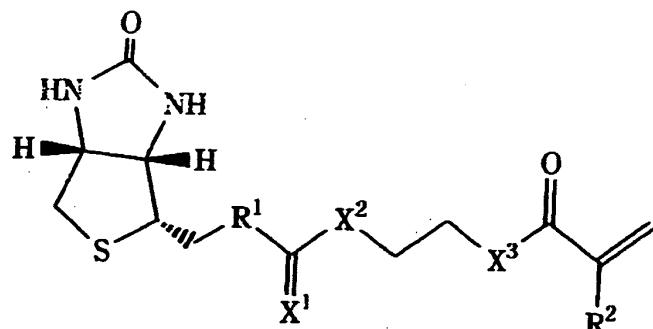
【0017】

更に好ましくは、式(I)で示される重合性ピオチン誘導体として、下記式(I a)～(I c)で表される重合性ピオチン誘導体が挙げられる。

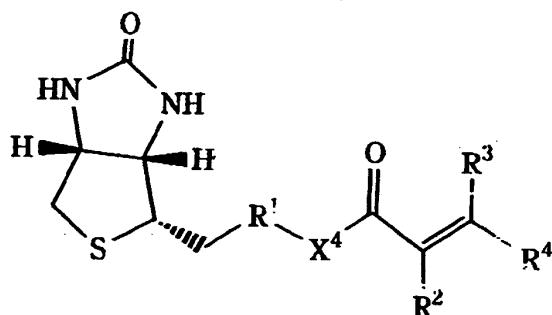
【0018】

【化4】

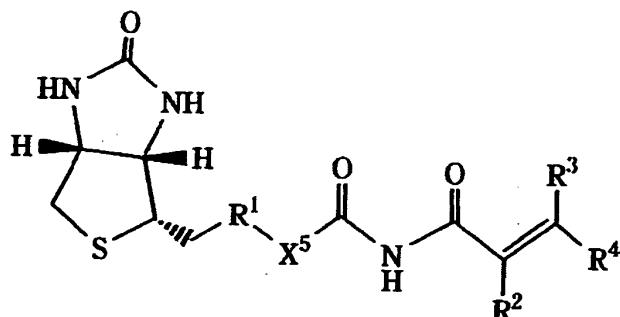
般式 (I a)



般式 (I b)



般式 (I c)



【0019】

一般式 (I a) ~ (I c) 中、R¹は単結合又は炭素数1~4のアルキレン基を示す。

X¹は酸素原子又は硫黄原子を示し、X²~X⁵はそれぞれ独立に、酸素原子又は-NH基を示す。

R²、R³及びR⁴はそれぞれ上記式 (I) で定義される通りある。

【0020】

式(I a)において、好ましくは、R¹は炭素数1～5のアルキレン基、より好ましくは炭素数2～4のアルキレン基を示し、R²は好ましくは水素原子又はメチル基を示し、X¹は酸素原子又は硫黄原子を示し、X²及びX³はそれぞれ独立して酸素原子又は-NH基を示す。

【0021】

式(I b)において、好ましくは、R¹は炭素数1～5のアルキレン基、より好ましくは炭素数2～4のアルキレン基を示し、R²は好ましくは水素原子又はメチル基を示し、R³及びR⁴はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示し、より好ましくは水素原子を示す。X⁴は好ましくは酸素原子又は-NH基を示す。

【0022】

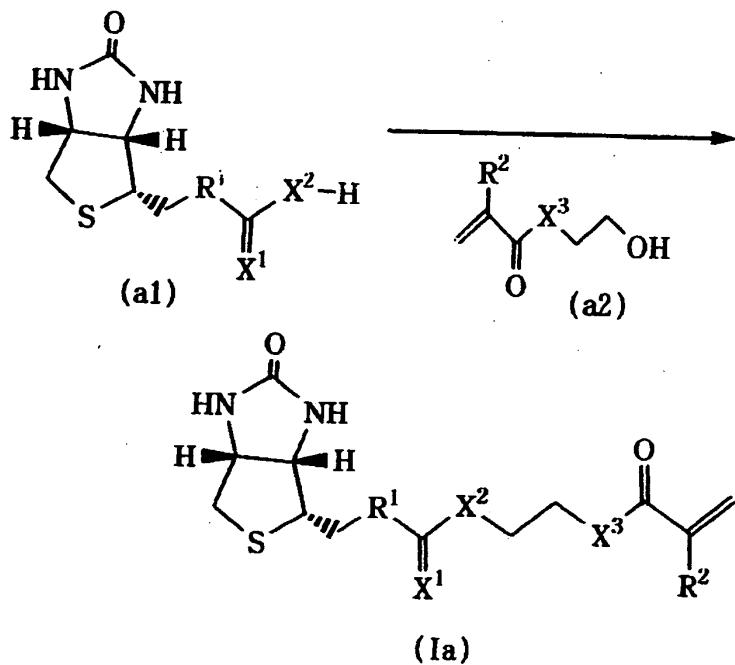
式(I c)において、好ましくは、R¹は炭素数1～5のアルキレン基、より好ましくは炭素数2～4のアルキレン基を示し、R²は好ましくは水素原子又はメチル基を示し、R³及びR⁴はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基又はアリール基を示し、より好ましくは水素原子を示す。X⁵は好ましくは酸素原子又は-NH基を示す。

【0023】

上記一般式(I a)で示される重合性ビオチン誘導体は、一般に下記一般式(a 1)で示されるビオチン又はビオチン誘導体の側鎖カルボキシル水酸基を適当な脱離基に変換後、下記一般式(a 2)で示されるアクリル誘導体と縮合反応させることにより得ることができる。

【0024】

【化5】

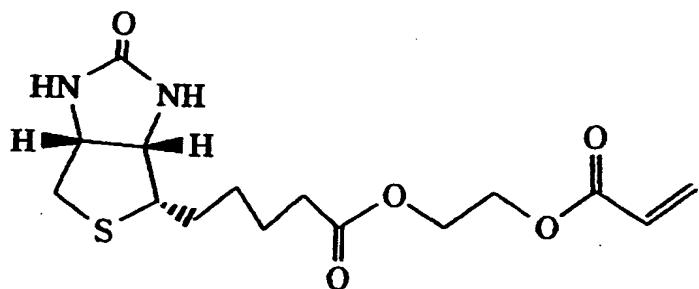
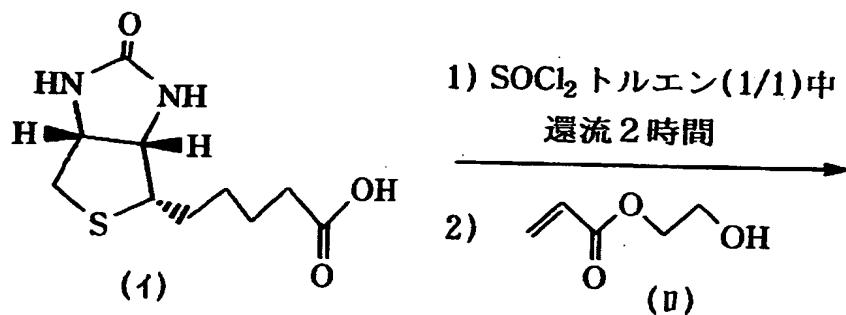


【0025】

具体的には、下記に示す通り、下記のビオチン（イ）のカルボキシル基を塩化チオニル／トルエン中で2時間還流した後、2-ヒドロキシエチルアクリレート（ロ）と縮合反応することにより2-ビオチニルエチルアクリレート（A）を得ることができる。

【0026】

【化6】



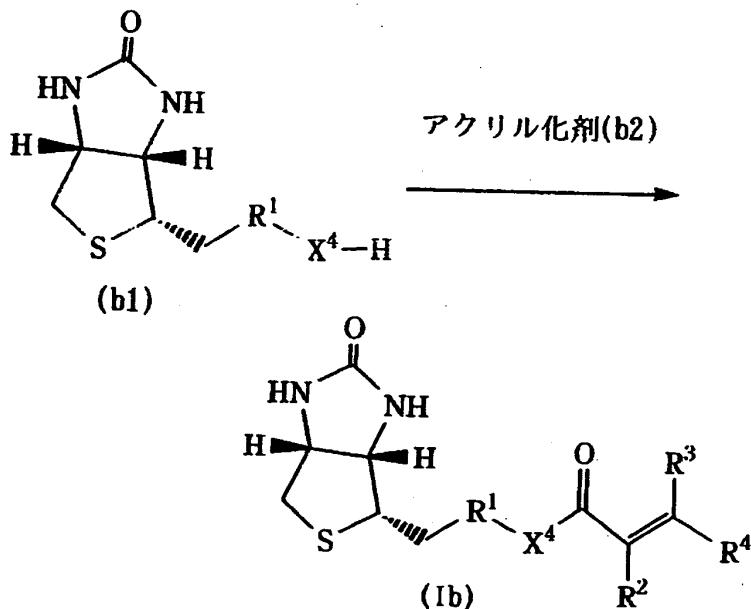
2-ビオチニルエチルアクリレート(A)

【0027】

上記一般式 (I b) で示される重合性ビオチン誘導体は、一般に下記一般式 (b 1) で示されるビオチン誘導体を、適当なアクリル化剤 (b 2) (メタクリル化剤等も含む、例えばアクリル酸、アクリル酸クロリド、無水アクリル酸、アクリロキシスクシンイミド等のアクリル化剤、メタクリル酸、メタクリル酸クロリド、無水メタクリル酸、メタクリロキシスクシンイミド等のメタクリル化剤) と反応させて得ることができる。

【0028】

【化7】



【0029】

ここで、式(b1)のビオチン誘導体は、式(a1)のビオチン又はビオチン誘導体を適当な還元剤で還元することによりアルコール体(X^4 =酸素原子)を得ることができ、更に該アルコール体の水酸基を脱離基機能を有する官能基に変換後、アミン誘導体($X^4=-NH$)と置換反応させることにより得ることができる。

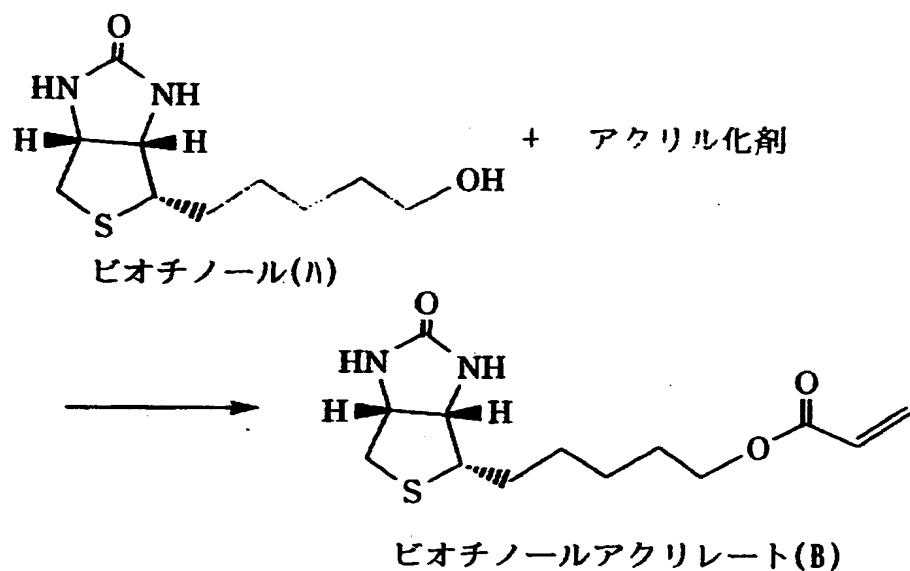
【0030】

その具体的製造方法を以下に示す。

下記に示す通り、市販のビオチン(Merck製)を、例えばソジウムボロハイドライド、ジイソブチルアルミニウムハイドライド、THFボラン、リチウムアルミニウムハイドライド(Flaster and Kohn, J. Heterocycl. Chem. (1981), 18(7), 1425-36)等の還元剤にて還元してビオチノール(ハ)を得、ビオチノール(ハ)をアクリル化剤と反応し、再結晶にてビオチノールアクリレート(ビ)を得ることができる。

【0031】

【化8】

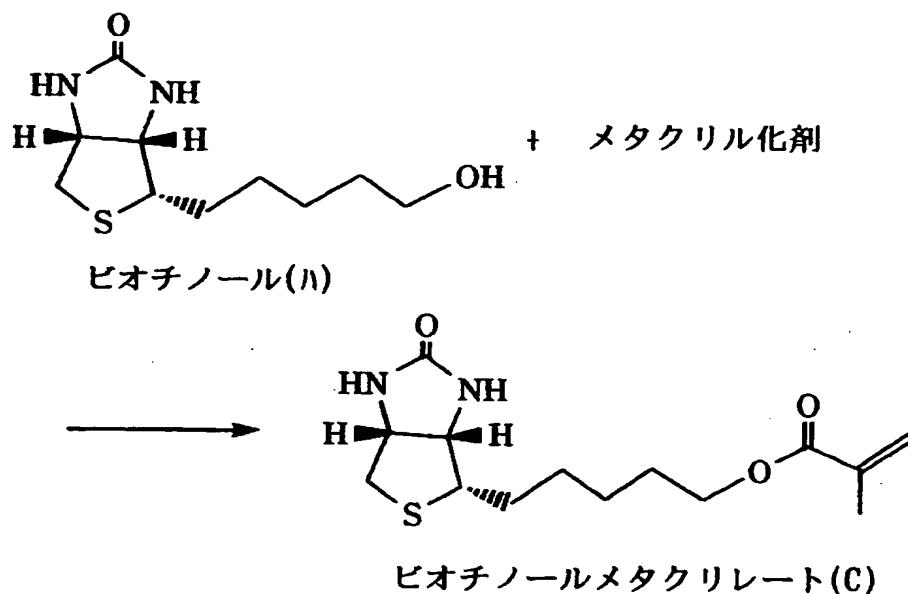


【0032】

上記ビオチノール（A）を、メタクリル剤と反応させて、ビオチノールメタクリレート（C）を得ることができる。

【0033】

【化9】

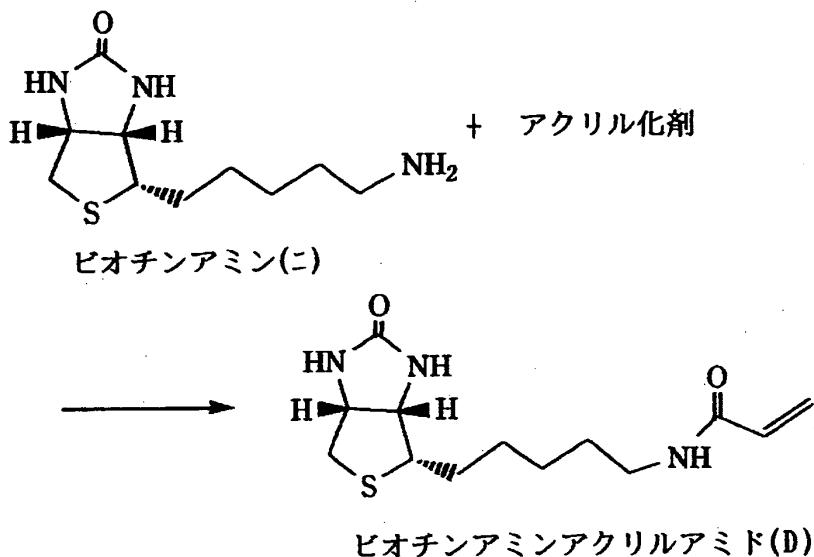


【0034】

また、下記に示す通り、ビオチノール（ハ）の水酸基を脱離機能を有する官能基に変換後、アミン誘導体と置換反応した後ビオチンアミン（ニ）を得、ビオチンアミンもしくはその塩等を縮合剤（ジエチルリン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等）の共存下、アクリル化剤と反応することにより、ビオチンアミンアクリルアミド（D）を得ることができる。

【0035】

【化10】

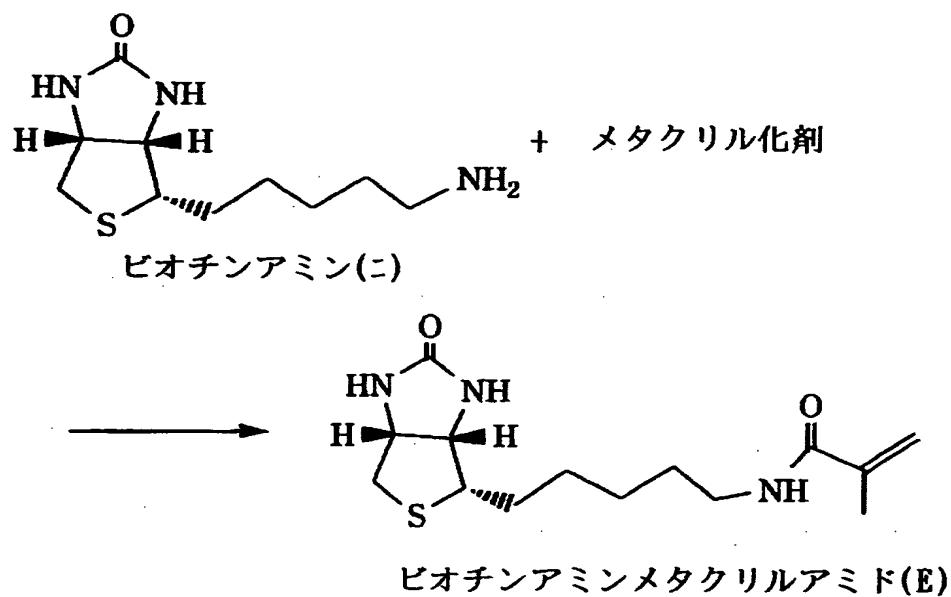


【0036】

同様に、ビオチンアミン（ニ）もしくはその塩を縮合剤（ジエチルリン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等）の共存下メタクリル化剤と反応することによりビオチンアミンメタクリルアミド（E）を得ることができる。

【0037】

【化11】

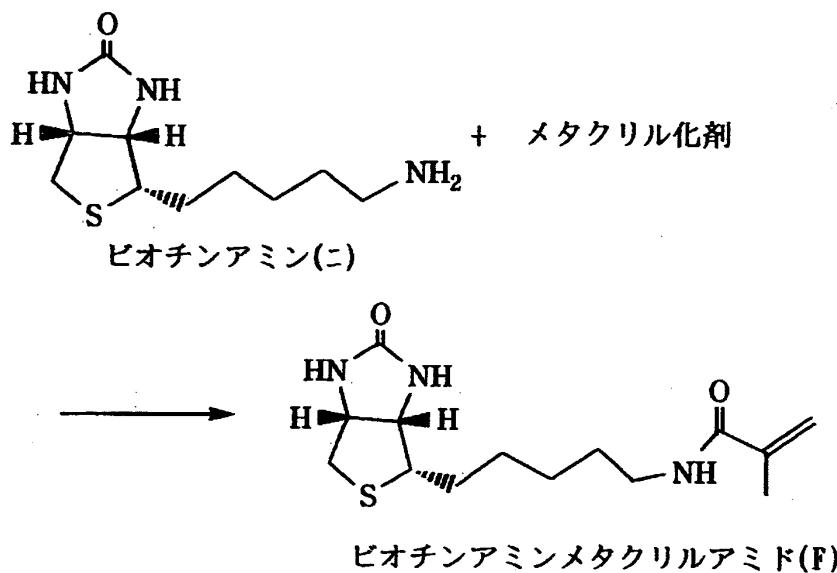


【0038】

更に、下記に示す通り、ノルビオチンアミン（ホ）もしくはその塩を縮合剤（ジエチルリン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等）の共存下にてアクリル化剤と反応することにより、ノルビオチンアミンアクリルアミド（F）が得られる。

【0039】

【化12】

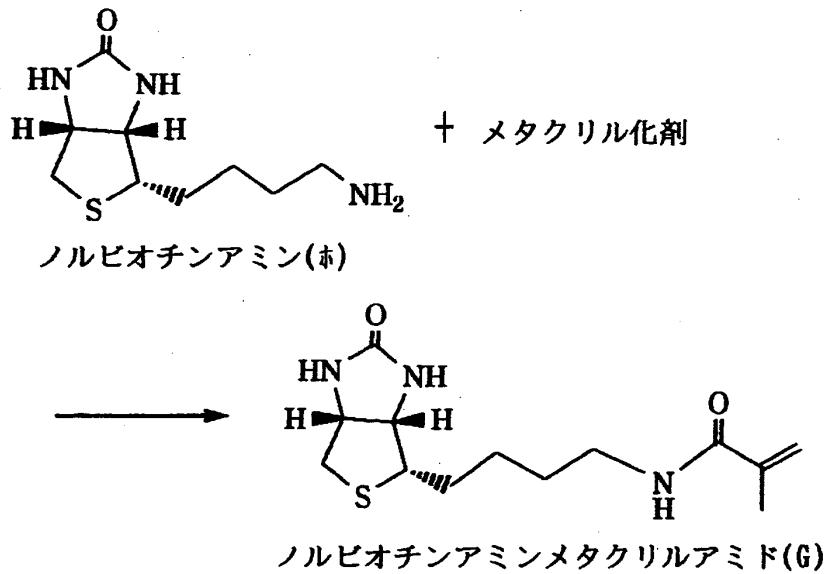


【0040】

同様に、ノルビオチンアミン（ホ）またはその塩を縮合剤（ジエチルリン酸シアニド、ジフェニルリン酸アジド等）の存在下メタクリル酸と反応することにより、ノルビオチンアミンメタクリルアミド（G）を得る。

【0041】

【化13】

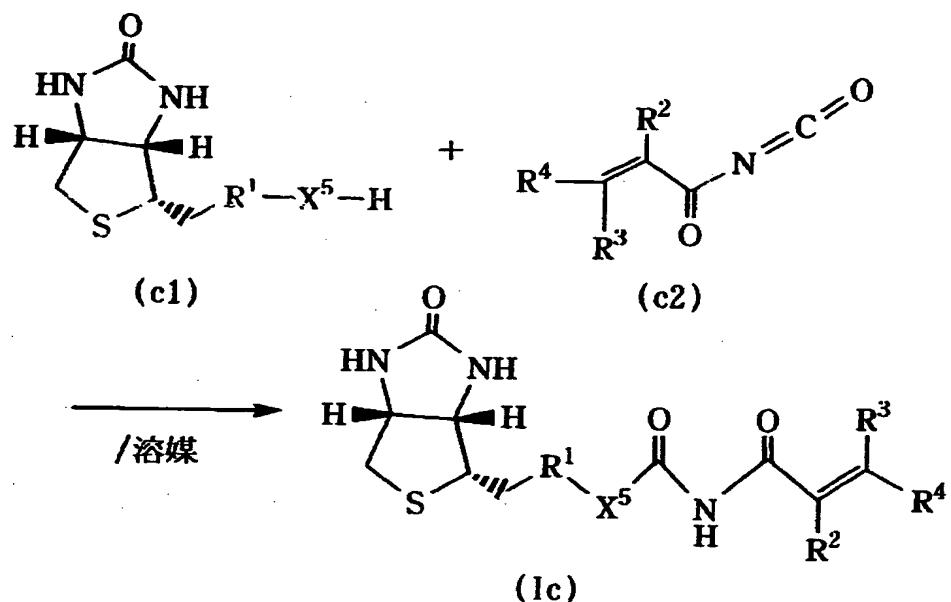


【0042】

上記一般式 (Ic) で示される重合性ビオチン誘導体は、一般に下記一般式 (c1) で示されるビオチン誘導体を、THF、DMSO、エーテル、DMF、時クロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、脂肪族炭化水素、ベンゼン、トルエン等の非プロトン性溶媒中で、式 (c2) で示されるイソシアネート化合物と反応させることにより得ることができる。

【0043】

【化14】

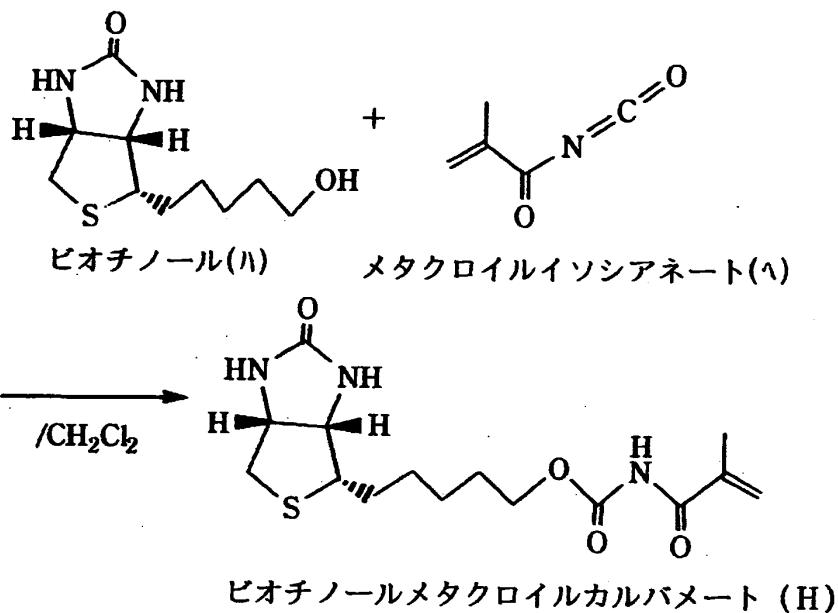


【0044】

具体的には、ビオチノール (ハ) を塩化メチレン等の溶媒中でメタクロイルイソシアネート (ヘ) と反応させることにより、ビオチノールメタクロイルカルバメート (H) を得ることができる。

【0045】

【化15】



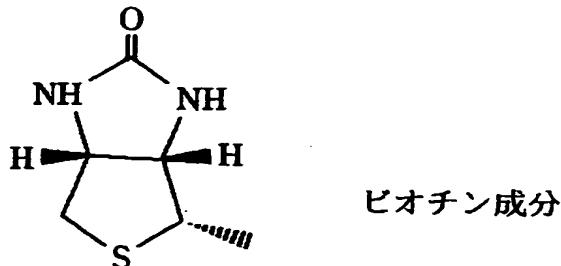
【0046】

上記のようにして得られた本発明の新規重合性ビオチン誘導体（ビオチンモノマー）は、ビオチンモノマーそのもの、あるいは該ビオチンモノマーと共に重合性を有するモノマーとともに、通常の方法に従い、例えば可溶な溶媒中に適當なラジカル開始剤を用いて重合することにより、ビオチン成分を含有する高分子誘導体（以下単にビオチン高分子と称することもある）を得ることができる。これにより、有用性の高いビオチンが固定化された高分子化合物を容易にかつ工業的に得ることができる。ここで、ビオチン成分とは、アビジンと高い結合性を有する部分をいい、具体的には、下記式（II）で示される成分を言う。

【0047】

【化16】

般式 (II)



【0048】

本発明では、他の任意のモノマー成分と共に重合させることにより、各モノマーの機能をそなえたビオチン高分子の合成、設計が可能である。その結果、多官能性、多重機能性高分子の合成が可能になる。高分子そのものの特性をいかしつつ、さらにこのビオチンモノマーを重合することによりビオチンモノマーの有用性を利用できる相乗効果のあるビオチンポリマーの製造が可能になる。

【0049】

上記重合性ビオチン誘導体と共に重合させることのできる共重合成分としては、重合性のあるものであれば特に限定されず、ビニル系、ビニリデン系、ブタジエン系等の種々の重合性モノマーを挙げることができる。更に具体的には、アクリルアミド、メタクリルアミド、スチレン、N-アルキルアクリルアミド、アクリル酸メチルエステル、酢酸ビニル、メタクリロニトリルメチルメタクリレート、イソブレンなどを挙げることができる。共重合比は特に限定的ではなく、必要に応じて任意の割合で共重合させることができる。

【0050】

反応後得られた高分子誘導体は、通常の方法に従い精製することが好ましい。例えばアルコール系溶媒に注ぎ沈殿させることにより精製することができる。

【0051】

本発明のビオチン高分子の具体的設計例、応用例を以下に述べる。

例えば、本発明に従うポリマーを架橋材を用いてゲル化すると、ゲル内部にまでビオチンを固定化したゲルの容易な設計・合成が可能となる。また磁性体にコ

ーチングしたり、分離材料として用いたりすることも容易になる。

【0052】

また、ビオチンモノマーの特異性を考慮し、他のモノマーとの共重合による分子設計で新たな特異性が出現するポリマーを得ることもできる。

【0053】

例えばアクリルアミド又はメタクリルアミドと本発明のビオチンモノマーと共に重合させて得た高分子はUCST（上限臨界溶液温度）を水溶液中および生理食塩水中で示すため、刺激応答材料としても魅力の有る製品として期待される。

また、NIPAM（N-アルキルアクリルアミド）はLCST（下限臨界溶液温度）を示す公知の高分子であるが（J.Macromol.Sci.Chem., A₂, 1441 (1968)）、例えばN-イソプロピルアクリルアミドとビオチンモノマーを共重合したものは、LCST特性を失うことなく、分子認識能も有することができる。

【0054】

また、UCSTを有する高分子誘導体（以下単にUCSTポリマーと称することもある）は、上記アクリルアミド又はメタクリルアミドと本発明のビオチンモノマーとの仕込み比（モル比）は、前者対後者の仕込み比が3～30の間であることが好ましい。UCSTの測定方法としては、得られたポリマーを水又は食塩水中に溶解し、石英セルに入れ、その光路に550nmの光源をあて、その透過率と温度の関係について調べる方法を採用することができる。

【0055】

LCST（下限臨界溶液温度）を有するポリマーは、分離剤、薬物放出制御、人工筋肉、センサー、アクチュエーター、細胞培養用担体等に広く利用される。LCSTの特性としては、相転移温度より高温側にて凝集し、低温側にて溶解する性質を示す。一方、本発明における上記高分子誘導体は、UCST特性を有することが見出された。このUCSTポリマーは、LCSTポリマーとは逆に、高温側にて溶解し、低温側にて凝集するものであるが、温度刺激応答性ポリマーとしてその応用範囲には、LCSTポリマーとは異なる材料開発の可能性が同様の分野において考えられる。

【0056】

特に、低温にて凝集するUCSTポリマーを含有する被覆膜上での細胞培養用担体においては、UCSTポリマーを被覆した担体上に培養された培養細胞とたん体を低温にて分離することができる（組織培養、17,9,349-353(1990)）。また、高温側の溶液中に共存する薬物と結合したポリマーが、温度変化を受け、低温環境に対応した凝集ポリマーに変化することにより、その薬物をポリマー内部に包含することになる。つまり、薬物放出制御が行われる（Macromolecules 1994, 27,947-952）。

【0057】

本発明のビオチンモノマーは生体機能を有する高分子材料として有用なモノマーであり、その用途は多岐にわたる（例えば、Chemical Sensors Vol.12 No.1(1996)p.8~11参照）。それはビオチンそのものがアビジンを分子認識するだけではなく、その他コラーゲンなどの蛋白とも結合するというように複数の物質を認識することができる生体機能材料ということができるからである。またアビジンを介したサンドイッチ構造を利用してアフィニティクロマトグラフィーや、多くの抗体を認識することを利用した免疫化学などの広範な分野に、その応用が考えられる。

【0058】

更に、本発明のビオチンを固定化したビオチンモノマーは工業的にも成り立つ経済性と効率性がある。

【0059】

【実施例】

以下の実施例において、本発明を例証するが、本発明は実施例に何ら限定されるものではない。

実施例1 [2-ビオチニルエチルアクリレート（化合物A）の合成]

ビオチン（化合物イ、Merck製）500mg、2-ヒドロキシエチルアクリレート200mg、塩化チオニル20ml及びトルエン20mlを室温にて混合し、還流を2時間行った。溶媒を減圧下除去し、クロロホルム-メタノール混合溶媒にてカラムクロマトを行い、溶媒を除去して、2-ビオチニルエチルアクリレート（化合物A）100mgを粉末物質として得た（収率14%）。

【0060】

NMR分析で目的化合物Aを良く指示した (inDMSO)。

NHおよびアクリル基結合H: 5H, δ 5.8~6, 6 α , 3 α , OCH₂: 6H, multi, δ 4.1~4.3, 6 α : 1H, multi, δ 3.1, 6 β : 1H, d, δ 2.8, CH₂: 8H, δ 1~1.6。

【0061】

実施例2 [ビオチノールアクリレート (化合物B) の合成]

2-1) ビオチン (化合物イ) からビオチノール (化合物ハ) の合成

リチウムアルミニウムハイドライド1.96g (51.64mmol) を脱水エーテル250mlに少しづつ入れて攪拌し、この中にビオチン (化合物イ) 1.96g (8.02mmol) をピリジン50mlに溶かした熱い溶液を滴下し、室温にて30分攪拌した。その後30分還流し、反応を終了した。過剰のリチウムアルミニウムハイドライドは水等にてつぶし、ピリジンを減圧下除去した。残査に6N塩酸を入れ、pHをほぼ2に合わせた後クロロホルムにて抽出し、溶媒を除去すると、白色粉末を得た。メタノールから再結晶してビオチノール (化合物ハ) 1.6mgを得た (収率85%)。

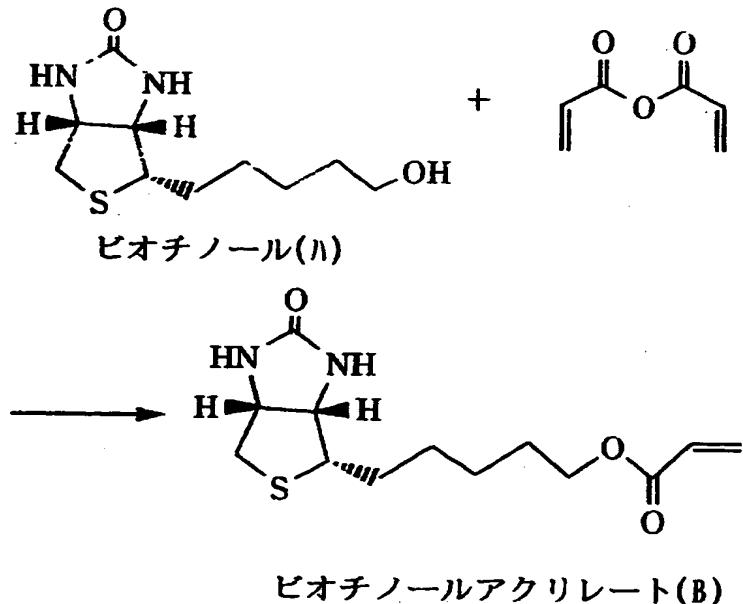
【0062】

2-2) ビオチノール (化合物ハ) とアクリル化剤の反応によるビオチノールアクリレート (化合物B) の合成

【0063】

【化17】

反応式1



【0064】

ビオチノール（化合物A）230mg (1mmol)、トリエチルアミン273mg (3mmol)、無水アクリル酸252mg (2mmol)、ジメチルアミノピリジン12.9mg (0.1mmol)及びジクロロメタン5mlを室温にて混合した後還流し、反応溶液をNaHCO₃飽和水溶液、飽和食塩水、水にて洗い反応を終了した。溶媒にて抽出し、クロロホルム-メタノール混合溶媒を展開溶媒としてカラムクロマトを行ったところ、ビオチノールアクリレート（化合物B）170mgを白色粉末として得た（収率59%：ビオチンメチルエステルからビオチノールアクリレートまで収率約50%）。

【0065】

NMR分析及び質量分析(MS)の結果は目的化合物Bを良く指示した
 NMR (in CDCl₃) H1, H2, H3: δ 6.4~δ 6.1, H3: 1H, d, δ 5.9, NH: 1H, s, δ 5.6, δ 5.1, 6a: 1H, multi, δ 4.5, 3a: 1H, tri, δ 4.3, OCH₂: 2H, tri, δ 4.1, H4: 1H, multi, δ 3.1, 6α: 1H, Quart, δ 2.9, 6β: 1H, d, δ 2.6, CH₂: 8H, δ 1~1.6.

MS 質量=285

【0066】

実施例3 [ビオチノールメタクリレート(化合物C)の合成]

実施例2で得たビオチノール(化合物ハ) 550mg (2.3mmol)、トリエチルアミン(Et_3N) 1.4g (7mmol)、無水メタクリル酸1.6g (4.6mmol)、ジメチルアミノピリジン60mg (0.5mmol)及びジクロロメタン(溶媒) 4mlを室温にて混合した後還流し、 NaHCO_3 飽和水溶液にて洗い反応を終了した。クロロホルムにて抽出し、クロロホルム-メタノール混合溶媒にてカラムクロマトを行ったところ、ビオチノールメタクリレート(化合物C) 630mgを白色粉末として得た(収率40%)。

【0067】

NMR分析及び質量分析(MS)の結果は目的化合物Cを良く指示した。

NMR (inDMSO) NH: 1H, s, δ 6.4, NH: 1H, s, δ 6.3, H2, H3: 1H, s, δ 6.0-5.6, 6 α : 1H, multi, δ 4.3, 3a, OCH_2 : 3H, multi, δ 4.1, 6 α : 1H, Quat, δ 3.1, 6 β : 1H, d, δ 2.8, CH_3 : 3H, s, δ 1.9, CH_2 : 8H, δ 1-1.6.

MS 質量=300

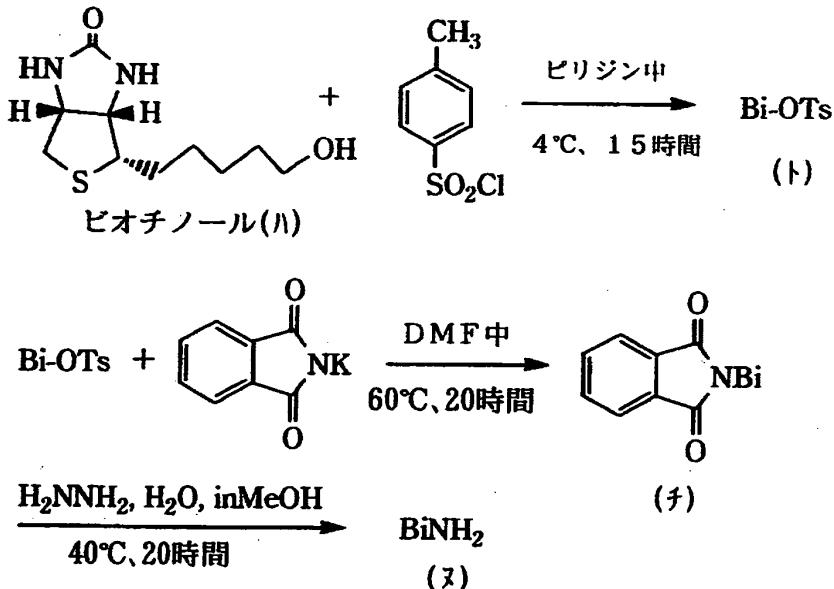
【0068】

実施例4 [ビオチンアミンアクリルアミド(化合物D)の合成]

【0069】

【化18】

反応式2



【0070】

4-1) ピオチノールトシレート(化合物ト)の合成

0℃にてp-トルエンスルfonylクロライド2400mg(12.6mmol)を混合したドライピリジン25ml溶液に実施例2で得たピオチノール(化合物ハ)1g(4.3mmol)を入れた。その後0℃にて15時間放置した。反応後、反応液を水にあけ、ジクロロメタンにて抽出した後溶媒を除去し、ピオチノールトシレート(化合物ト)900mgを得た(収率54%)。

【0071】

4-2) ピオチンフタルイミド誘導体(化合物チ)の合成

上記で得たピオチノールトシレート(化合物ト)900mg(2.3mmol)を脱水ジメチルホルムアミド(DMF)14mlに溶かし、フタルイミドカリウム塩481mg(2.6mmol)をいれて60℃にて20時間加熱した。反応終了後、水をいれるとフタルイミド誘導体が析出した。これをろ過し乾燥して、ピオチンフタルイミド誘導体(化合物チ)570mgを得た(収率68%)。

【0072】

4-3) ピオチンアミン(化合物ヌ)の合成

メタノールにゆっくりヒドラジンモノ水和物626mgを入れ(0.5M、MeOH溶液にする)、さらに上記で得られたピオチンフタルイミド誘導体(化合物チ)570mgをいれた。チッソ雰囲気下40℃にて20時間反応させたところ、ピオチンアミン(B*i*NH₂)未精製物(化合物ヌ)411mgを得た(収率ほぼ100%)。

【0073】

4-4) ピオチンアミンアクリルアミド(化合物D)の合成

上記ピオチンアミン(化合物ヌ)を塩酸により塩酸塩にして得たピオチンアミン塩酸塩133mg(0.5mmol)とアクリル酸36μl(0.5mmol)をジメチルホルムアミド(DMF;溶媒)4mlに溶かし、0℃に保ち、攪拌した。これにジフェニルリン酸アジド(DPPA)165μl(0.6mmol)を滴下し0℃に保った。さらにトリエチルアミン208μl(1.5mmol)を1mlのDMFに溶かした溶液を滴下し0℃にて2~4時間攪拌した。

その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後DMFを飛ばし、クロロホルムにて抽出し、1N塩酸とNaHCO₃、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。残

査をTHF-n-ヘキサン混合溶媒に溶かしビオチンアミンアクリルアミド（化合物D）40mg（収率25%）を沈澱物として得た。

【0074】

NMR分析及び質量分析（MS）の結果は目的化合物Dを良く指示した。

NMR (inDMSO) CONH: 1H, s, δ 7.9, H1, H2, H3: 3H, multi, δ 7.5-6.9, NH, NH: 1H, s, δ 6.4, δ 6.3, 6a: 1H, multi, δ 4.3, 3a: 1H, multi, δ 4.1, CONHCH₂, H4: 3H, multi, δ 3.5-3.0, 6 α : 1H, Quart, δ 2.8, 6 β : 1H, d, δ 2.5, CH₂: 8H, δ 1-1.6.

MS 質量=284

【0075】

実施例5 [ビオチンアミンメタクリルアミド（化合物E）の合成]

ビオチンアミン塩酸塩100mg (0.38mmol)とメタクリル酸38 μ l (0.43mmol)をDMF（溶媒）5mlに溶かし、0℃に保ち攪拌した。これにDPPA130 μ l (0.5mmol)を滴下し0℃に保った。さらにトリエチルアミン156 μ l (1.1mmol)を1mlのDMFに溶かした溶液を滴下し0℃にて2~4時間攪拌した。その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後DMFを減圧下除去し、クロロホルムにて溶解し、1N塩酸とNaHCO₃、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。これをTHF-n-ヘキサン混合溶媒に溶かしビオチンアミンメタクリルアミド（化合物E）40mgを沈澱物として得た（収率35%）。

【0076】

NMR分析及び質量分析（MS）の結果は目的化合物Fを良く指示した。

NMR (inDMSO) CONH: 1H, s, δ 7.8, NH, NH: 1H, s, δ 6.4, δ 6.3, H1, H2: 1H, s, δ 5.6, δ 5.3, 6a: 1H, multi, δ 4.3, 3a: 1H, multi, δ 4.1, CONHC₂, H4: 3H, multi, δ 3.5-3.0, 6 α : 1H, Quart, δ 2.8, 6 β : 1H, d, δ 2.5, CH₃: 3H, δ 1.8, CH₂: 8H, δ 1-1.6.

MS 質量=299

【0077】

実施例6 [ノルビオチンアミンアクリルアミド（化合物F）の合成]

ノルビオチンアミン塩酸塩（Merck製）125mg (0.5mmol)とアクリル酸36 μ l (0

.5mmol)をジメチルホルムアミド(DMF; 溶媒)3mlに溶かし、0℃に保ち、攪拌した。これにジフェニルリン酸アジド(DPPA)165μl(0.6mmol)を滴下し0℃に保った。さらにトリエチルアミン208μl(1.5mmol)を1mlのDMFに溶かした溶液を滴下し0℃にて2~4時間攪拌した。

その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後DMFを飛ばし、クロロホルムにて抽出し、1N塩酸とNaHCO₃、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。残査をTHF-nヘキサン混合溶媒に溶かしノルビオチンアミンアクリルアミド(化合物F)30mgを沈殿物として得た(収率20%)。

【0078】

NMR分析で目的化合物Eを良く指示した(inDMSO)

CONH: 1H, s, δ 7.9, H1, H2, H3: 3H, multi, δ 7.5~6.9, NH, NH: 1H, s, δ 6.4, δ 6.3, 6a: 1H, multi, δ 4.3, 3a: 1H, multi, δ 4.1, CONHCH₂, H4: 3H, multi, δ 3.5~3.0, 6α: 1H, Quart, δ 2.8, 6β: 1H, d, δ 2.5, CH₂: 6H, δ 1~1.6。

【0079】

実施例7 [ノルビオチンアミンメタクリルアミド(化合物G)の合成]

ノルビオチンアミン塩酸塩94mg(0.38mmol)とメタクリル酸38μl(0.43mmol)をDMF(溶媒)3mlに溶かし、0℃に保ち、攪拌した。これにDPPA130μl(0.5mmol)を滴下し0℃に保った。さらにトリエチルアミン156μl(1.1mmol)を1mlのDMFに溶かした溶液を滴下し0℃にて2~4時間攪拌した。その後室温に保ち終夜反応させた。反応終了後DMFを除去し、クロロホルムにて抽出後、1N塩酸とNaHCO₃、水にてクロロホルム層を洗い、溶媒を除去した。これをTHF-nヘキサン混合溶媒に溶かしノルビオチンアミンメタクリルアミド(化合物G)30mgを沈殿物として得た(収率30%)。

【0080】

NMR分析で目的化合物Gを良く指示した(inDMSO)

CONH: 1H, s, δ 7.8, NH, NH: 2H, d, δ 6.4, H1, H2: 1H, s, δ 5.6, δ 5.3, 6a: 1H, multi, δ 4.3, 3a: 1H, multi, δ 4.1, CONHCH₂, H4: 3H, multi, δ 3.5~3.0, 6α: 1H, Quart, δ 2.8, 6β: 1H, d, δ 2.5, CH₃: 3H, δ 1.8, CH₂: 6H,

δ 1-1.6。

【0081】

実施例8 [ビオチノールメタクロイルカルバメート (化合物H) の合成]

メタクロイルイソシアネート (化合物ヘ) 266mgを塩化メチレン20mlに溶かし0℃に保ち、ビオチノール500mgを含む塩化メチレン溶液を徐々に滴下し、1時間攪拌し、更に室温で10時間攪拌した。

反応終了後、飽和重曹水30mlを加え、クロロホルムにて抽出した。クロロホルム層を減圧下溶媒を留去し、残査をシリカゲルを用いてカラムクロマトを行った。得られた粗目的物をイソプロパノールを用いて再結晶を行い、ビオチノールメタクロイルカルバメート (化合物H) 120mgを得た (収率16%)。

【0082】

NMR分析で目的化合物Hを良く指示した。

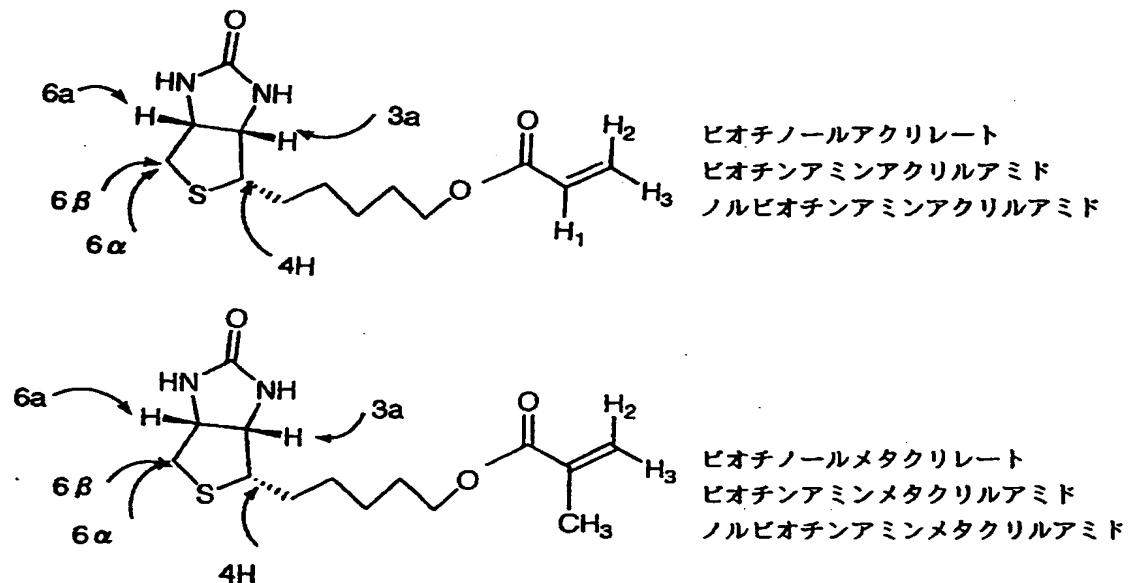
CONHCO : 1H, s, δ 8.4~8.5, NH : 1H, s, δ 6.2, H2, H3 : 1H, s, δ 5.8, δ 5.6, NH : 1H, s, δ 5.5, 6a : 1H, multi, δ 4.5, 3a : 1H, multi, δ 4.3, 0CH₂ : 2H, tri, δ 4.2, H4 : 1H, multi, δ 3.2, 6 α : 1H, Quart, δ 2.9, 6 β : 1H, d, δ 2.7, CH3 : 3H, s, δ 1.9, CH₂ : 8H, δ 1.2~1.7。

【0083】

尚、上記NMRデータの各プロトン表示は下記の通りである。

【0084】

【化19】



(アミドは酸素原子の代わりにNHに変わる)

【0085】

実施例9～13 [アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体の合成]

アクリルアミド710mg、ビオチノールアクリレート（化合物B）142mg、ジメチルスルフォキシド10ml及び2, 2'-アゾビス（2, 4-ジメチルバレニトリル）8.5mgを混合し、チッソ雰囲気下脱気した。その後徐々に温度を昇温し、攪拌しながら45℃にて反応を2～3時間行った。最後に65℃付近にまで昇温して反応を完結させた。反応系に溶媒（ジメチルスルフォキシド）を数ml加え、エタノールに注ぐと沈殿を生じた（收率95%以上）。沈殿は乾燥した後、水に溶解し透析した。水を除去してポリマーの精製を終了した。

【0086】

上記アクリルアミドとビオチノールアクリレートとの仕込み比（モル比）を種々変え、開始剤を2種類（上記開始剤2, 2'-アゾビス（2, 4-ジメチルバレニトリルの代わりに、アゾビスイソブチロニトリルを使用。各々の反応温度は異なり分子量も異なる）を使用して重合したポリマーの結果を表-2に示す。

【0087】

【表2】

表-2 アクリルアミドとビオチノールアクリレートの共重合高分子の仕込み比
(モル比)を変化した場合に、測定溶液の透過率が50%を示す温度

2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレノニトリル)を開始剤とした場合				アゾイソブチロニトリルを開始剤とした場合					
	仕込み比 AAm:BA	透過率 50%の溶液温度 (℃)		重量平均 分子量		仕込み比 AAm:BA	透過率 50%の溶液温度 (℃)		重量平均 分子量
実施例9	30:1	2 (水中)	2 (生食中)	140,000	実施例12	20:1	12 (水中)	~5 (生食中)	32,000
実施例10	20:1	18 (水中)	15 (生食中)	89,000	実施例13	10:1	4.5 (水中)	50 (生食中)	18,000
実施例11	15:1	37 (水中)	28 (生食中)	98,000	—	—	—	—	—

- 分子量測定は TOSO の G4000PW を使用した。
- 生食中：生理的食塩水中にて透過率を測定した場合
- 水中：蒸留水中にて透過率を測定した場合。
- 仕込み比：モル比
- 2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレノニトリル)使用の場合の重合温度は 45℃～65℃
- アゾビスイソブチロニトリル使用の場合の重合温度は 80℃
- 実施例9, 10 の透過率測定溶液濃度：6mg/ml
- 実施例11 の水中透過率測定溶液濃度：10mg/ml
- 実施例11 の生食中透過率測定溶液濃度：6mg/ml
- 実施例12 の透過率測定溶液濃度：22.4mg/ml
- 実施例13 の透過率測定溶液濃度：6mg/ml
- AAm：アクリルアミド BA：ビオチノールアクリレート

【0088】

また、アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体（仕込みモル比 20:1）のNMRデータ (inDMSO) は以下の通りであった。

4ピーカ：δ7.5～6.5、s：δ6.4、s：δ4.3、s：δ4.1、s：δ3.1、broad
：δ2.8、broad：δ2.1、broad：δ1.5～1.3。

【0089】

尚、仕込み比（モル比）が変化しても下記と同様のピーカを示した。更に、ビオチノールアクリレートのホモポリマーの場合は、δ7.5～6.5部分のピーカが約1本になり、その他は共重合体と同じところにピーカが見られた。

【0090】

更に、上記アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体（仕込みモル比20:1）の上限臨界溶液温度（UCST）を図1～図3に示す。

即ち、図1は昇温時と降温時の温度と透過率の関係を示す図であり、上記アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体（仕込みモル比20:1）の水中におけるUCST（コポリマー濃度10mg/ml）を示す。

【0091】

図2は生理的食塩水中におけるアビシンを認識したコポリマーの透過率変化（降温時）を示す図であり、アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体（仕込み比20）の生理的食塩水中（コポリマー濃度6mg/ml）におけるアビシン認識能とUCSTの変化（降温時の透過率のみ）を示す。

【0092】

図3は、N-イソプロピルアクリルアミドとビオチノールアクリレートコポリマーのアビシン添加によるLCST変化（降温時）を示す図であり、上記コポリマーを含有する水溶液中にアビシンを添加すると、その透過率変化が少なくなり、コポリマーが溶け易くなることが判る。

このように、本発明のビオチンモノマーを共重合成分として含有する共重合体は、温度刺激応答材料としての特性を有することがわかる。

【0093】

【発明の効果】

本発明の重合性ビオチン誘導体（ビオチンモノマー）は重合性が高く、本モノマーを用いることにより、種々の分野に適用可能なビオチン成分を含有する高分子誘導体が容易に製造できる。

特に本発明によれば、他のモノマーとの共重合により、各モノマーの機能をそなえた高分子の合成、設計が可能であり、特に、ビオチン成分のビオチン-アビシン結合性に起因する有効性を利用しつつ、他の共重合成分や添加剤を工夫することにより、広範な範囲に適用可能な種々の多官能性、多重機能性の高分子を合成、設計することが可能となる。

例えば、ビオチンモノマーとアクリルアミドまたはメタクリルアミドとの共重合体は、UCSTを水溶液中及び生理食塩水中で示すため、刺激応答材料として

も魅力ある製品となる。

また、ビチオンモノマーは、生体機能を有する高分子材料として有用なモノマーであり、その用途は、イムノアッセイ、バイオセンサー、DNA操作、分離材、臨床療法など多岐にわたる。それは、ビオチンそのものがアビジンを分子認識するだけでなく、その他多くの抗体やコラーゲンなども認識する生体機能材料であるためであり、例えばアビジンを介したサンドイッチ構造等により種々応用できる。

更に、上記高分子誘導体は工業的に製造可能であり、優れた経済性及び効率性を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

昇温時と降温時の温度と透過率の関係であり、アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体（仕込み比20）の水中におけるUCST（コポリマー濃度10mg/ml）を示す。

【図2】

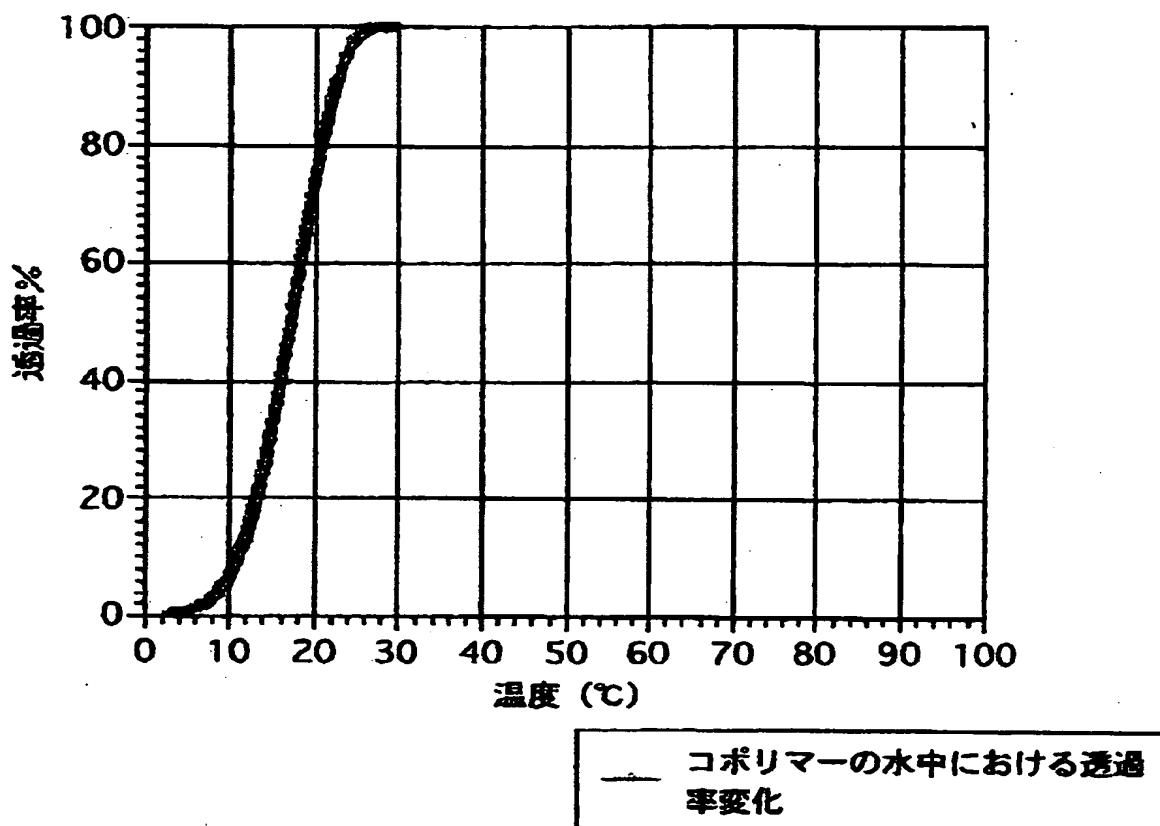
生理的食塩水中におけるアビジンを認識したコポリマーの透過率変化（降温時）であり、アクリルアミド/ビオチノールアクリレート共重合体（仕込み比20）の生理的食塩水中（コポリマー濃度6mg/ml）におけるアビジン認識能とUCSTの変化（降温時の透過率のみ）を示す。

【図3】

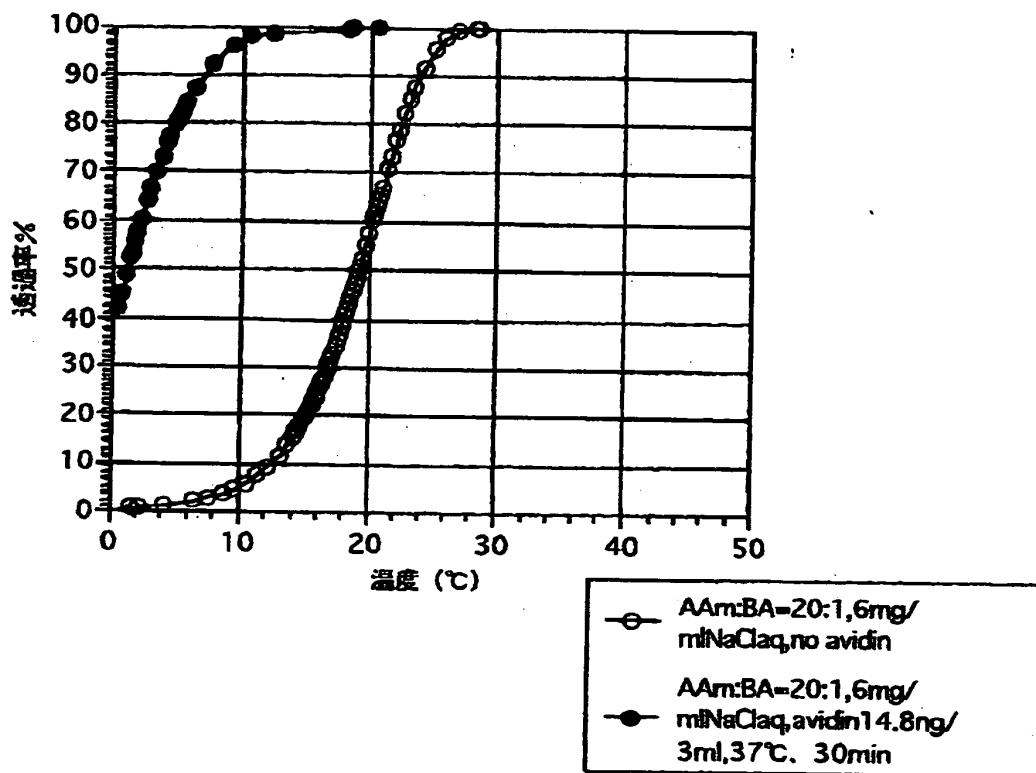
N-イソプロピルアクリルアミドとビオチノールアクリレートコポリマーのアビジン添加によるLCTS変化（降温時）を示す。

【書類名】 図面

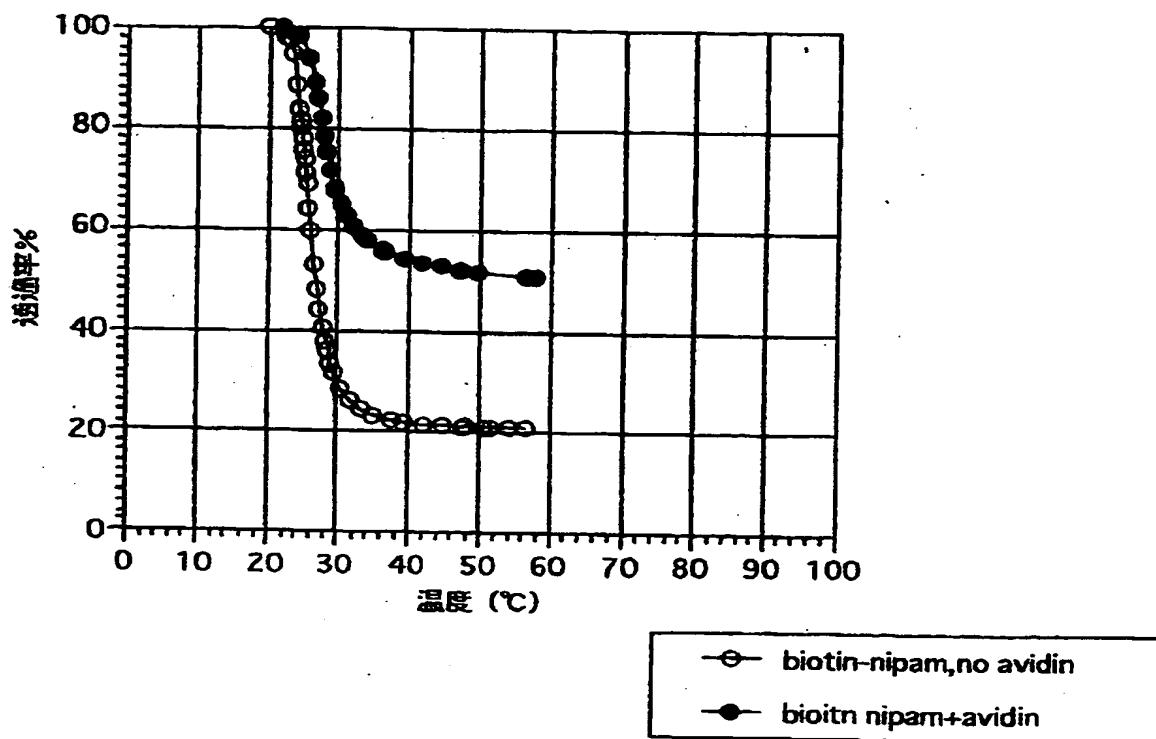
【図 1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

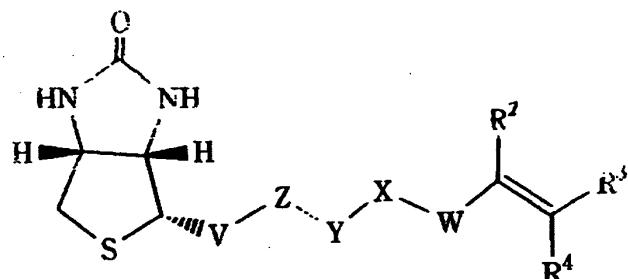
【要約】

【課題】 種々の分野に応用可能なビオチン成分を含有し、更に多官能性、多重機能性の高分子を工業的に合成、設計可能とする。

【解決手段】 式(I)で示される重合性ビオチン誘導体(式中、R²は水素原子又はアルキル基、R³及びR⁴は各々水素原子、アルキル基又はアリール基を示す。Wは単結合、カルボニル基、チオカルボニル基又は炭素数1～5のアルキレン基、Xは単結合、炭素数1～8の炭化水素結合、酸素原子又は-NH基、Yは単結合、カルボニル基、チオカルボニル基、1,2-ジオキシエチレン基又は1,2-ジアミノエチレン基、Zは単結合、カルボニル基、チオカルボニル基、炭素数1～5のアルキレン基、酸素原子又は-NH基、Vは単結合、炭素数1～5のアルキレン基を示す)を用いて、ビオチン成分を含有する高分子化合物を製造する。

【化1】

般式(I)



【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第215667号
受付番号	59900731090
書類名	特許願
担当官	椎名 美樹子 7070
作成日	平成11年11月24日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【特許出願人】

【識別番号】	597071652
【住所又は居所】	東京都台東区柳橋2丁目22番13号
【氏名又は名称】	財団法人 化学技術戦略推進機構

【指定代理人】

【識別番号】	220000390
【住所又は居所】	茨城県つくば市東1-1
【氏名又は名称】	工業技術院物質工学工業技術研究所長

【代理人】

【識別番号】	100073874
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
【氏名又は名称】	萩野 平

【復代理人】

【識別番号】	100073874
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
【氏名又は名称】	萩野 平

【選任した代理人】

【識別番号】	100093573
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
【氏名又は名称】	添田 全一

【選任した代理人】

次頁有

認定・付加情報（続き）

【識別番号】 100105474
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
 【氏名又は名称】 本多 弘徳
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100090343
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
 【氏名又は名称】 栗宇 百合子
 【選任した復代理人】
 【識別番号】 100093573
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
 【氏名又は名称】 添田 全一
 【選任した復代理人】
 【識別番号】 100105474
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
 【氏名又は名称】 本多 弘徳
 【選任した復代理人】
 【識別番号】 100090343
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
 【氏名又は名称】 栗宇 百合子

次頁無

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成11年10月13日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 平成11年特許願第215667号
【補正をする者】
【識別番号】 000001144
【氏名又は名称】 工業技術院長 梶村 翔二
【補正をする者】
【識別番号】 597071652
【氏名又は名称】 財団法人化学技術戦略推進機構
【代理人】
【識別番号】 100073874
【弁理士】
【氏名又は名称】 萩野 平
【電話番号】 03-5561-3990
【代理関係の特記事項】 特許出願人財団法人化学技術戦略推進機構の代理人
【復代理人】
【識別番号】 100073874
【弁理士】
【氏名又は名称】 萩野 平
【電話番号】 03-5561-3990
【代理関係の特記事項】 特許出願人工業技術院長の復代理人
【発送番号】 061974
【手続補正 1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 提出物件の目録
【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 持分について証明する書面 1

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第215667号
受付番号	59901001768
書類名	手続補正書
担当官	椎名 美樹子 7070
作成日	平成11年11月24日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【補正をする者】

【識別番号】	597071652
【住所又は居所】	東京都台東区柳橋2丁目22番13号
【氏名又は名称】	財団法人 化学技術戦略推進機構

【代理人】

【識別番号】	100073874
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
【氏名又は名称】	萩野 平

【復代理人】

【識別番号】	100073874
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所
【氏名又は名称】	萩野 平

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [00001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名 工業技術院長

出願人履歴情報

識別番号 [597071652]

1. 変更年月日 1998年 3月26日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都台東区柳橋2丁目22番13号

氏 名 財団法人 化学技術戦略推進機構